

**PCT**      WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <p style="text-align: center;"><b>A61K 31/19, 31/60</b></p>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/58639</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02939            (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1998 (19.05.98)             (30) Prioritätsdaten:                  197 26 871.4      24. Juni 1997 (24.06.97)      DE             (71)(72) Anmelder und Erfinder: KREUTZ, Werner [DE/DE]; Am                  Schloßberg, D-79219 Staufen (DE).             (74) Anwalt: LEDERER, KELLER &amp; RIEDERER; Prinzregenten-                  strasse 16, D-80538 München (DE).         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT,                  BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,                  MC, NL, PT, SE).             Veröffentlicht                  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02939 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1998 (19.05.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 26 871.4      24. Juni 1997 (24.06.97)      DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: KREUTZ, Werner [DE/DE]; Am Schloßberg, D-79219 Staufen (DE).  (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02939 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1998 (19.05.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 26 871.4      24. Juni 1997 (24.06.97)      DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: KREUTZ, Werner [DE/DE]; Am Schloßberg, D-79219 Staufen (DE).  (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten- strasse 16, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>			
(54) Title: SYNERGISTICALLY ACTING COMPOSITIONS FOR SELECTIVELY COMBATING TUMOR TISSUE (54) Bezeichnung: SYNERGISTISCH WIRKENDE ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR SELEKTIVEN BEKÄMPFUNG VON TUMORGeweBE  (57) Abstract  <p>The invention relates to compositions exhibiting a substantially selective, strong cytotoxic effect on tumor tissue. The invention is characterized in that certain benzoic acid derivatives have a strong synergistic effect when mixed and destroy cancer cells in a selective manner in a pH range of 7 or less, e.g. 6.5 to 7.</p> (57) Zusammenfassung  <p>Erfindungsgemäß werden Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt, die eine starke cytotoxische Wirkung weitgehend selektiv auf Tumorgewebe aufweisen. Die Erfindung beruht darauf, daß bestimmte Benzoesäurederivate im Gemisch eine starke synergistische Wirkung zeigen und Krebszellen selektiv in einem pH-Bereich von 7 oder darunter, wie von 6,5 bis 7, abtöten.</p>				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

-----  
**Synergistisch wirkende Zusammensetzungen zur selektiven  
Bekämpfung von Tumorgewebe**  
-----

Die Erfindung betrifft neue synergistisch wirkende Zusammensetzungen, die selektiv Tumorgewebe bekämpfen, während gesundes Gewebe praktisch nicht angegriffen wird. Die neuen Zusammensetzungen eignen sich daher hervorragend für die Krebstherapie.

Arzneimittel nach dem Stand der Technik, die bei der Chemotherapie eingesetzt werden, bringen in der Regel nur Teilerfolge, d.h. sie führen zu keiner endgültigen Heilung. Darüberhinaus wirken die im Stand der Technik eingesetzten Substanzen häufig nur bei einer bestimmten Tumorkategorie. Ein weiterer Nachteil der derzeit bekannten Chemotherapeutika sind ihre oft schädlichen Nebenwirkungen, da Chemotherapeutika generell auf proliferierende Gewebe cytostatisch wirken können. Die bekannten Chemotherapeutika sind auch bei der Bekämpfung der Metastasenbildung nicht zufriedenstellend, und dies ist einer der Hauptgründe, die bislang einen entscheidenden Erfolg bei der Krebstherapie verhinderten.

Daß Tumorgewebe im extrazellulären Milieu einen abgesenkten mittleren pH-Wert von etwa 6,5 bis 7,0 aufweist und der pH-Wert auf der Krebszellenoberfläche sogar bis 5 absinken kann, während der pH-Wert im Normalgewebe und im Blut etwa 7,2 bis 7,5 beträgt, ist bekannt und wird z.B. in der DE-A 44 07 484 und in Tumor Biol., 1994, 15: 304-310 beschrieben. So weist

jede Tumorart einen intrinsischen mittleren interzellulären pH-Wert auf, der z.B. bei Brusttumoren ca. 6,7 und bei Colontumoren ca. 6,9 beträgt.

In den vorstehend genannten Druckschriften wird offenbart, daß durch die Absenkung des pH-Bereichs in Tumorzellen die natürliche Immunabwehr blockiert wird, da die körpereigenen Abwehrzellen mit voller Cytotoxizität nur im leicht basischen Milieu von mehr als 7 auf Krebs-Target-Zellen reagieren. Die DE-A 44 07 484 schlägt daher vor, das saure externe Milieu von Krebszellen auf das normale physiologische pH-Niveau von 7 bis 7,5 zu bringen und dadurch die Krebszellen durch die körpereigene Immunabwehr zu bekämpfen. Hierzu wird das saure externe Milieu von Krebszellen entweder durch künstliche Alkalisierungmaßnahmen oder durch die Verhinderung des Ansäuerungsprozesses selbst auf einen physiologischen pH-Wert von 7 bis 7,5 gebracht.

Die in der DE-A 44 07 484 beschriebenen Arzneimittel stellen zwar einen Fortschritt in der Krebstherapie dar, es wäre jedoch wünschenswert, Arzneimittel zur Verfügung zu haben, die neben der körpereigenen Immunabwehr Tumorzellen selektiv bekämpfen und damit als relativ nebenwirkungsarme Chemotherapeutika verwendet werden können.

Entsprechend schlägt die WO 96/30003 vor, solche Verbindungen zur Bekämpfung von Tumorgewebe zu verwenden, die bei einem pH-Wert von kleiner 7 protoniert werden oder eine Substanz freisetzen, wobei die protonierte Verbindung oder die freigesetzte Substanz auf Zellen stärker zerstörend wirkt als die unprotonierte Verbindung bzw. die Verbindung vor Freisetzen der Substanz. Die WO 96/30003 offenbart für diese Verbindungen allgemeine Formeln, unter die eine Vielzahl von chemischen Verbindungen fallen. Als wirkungsvoll wird dort unter anderem auch die 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure genannt. Auch Acetylsalicylsäure wird als mögliche wirksame Verbindung genannt, jedoch ist diese Verbindung nicht bevorzugt.

Die Verbindungen der WO 96/30003 und auch die dort allgemein vorgeschlagenen Gemische aus zwei und mehr Verbindungen weisen zwar bereits eine gute Anti-Tumorwirkung auf, es besteht jedoch nach wie vor ein Bedarf an Arzneimitteln, die eine verbesserte Anti-Tumorwirkung zeigen, insbesondere bei pH-Werten von 7,0 oder darunter, insbesondere im Bereich von 6,5 bis 7,0.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, die eine starke cytotoxische Wirkung weitgehend selektiv auf Tumorgewebe aufweisen, insbesondere in einem pH-Bereich von etwa 6,5 bis etwa 7,0.

Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen wirken im Prinzip auf die gleiche Art und Weise wie die in der WO 96/30003 offenbarten Benzoessäurederivate. Es hat sich jedoch gezeigt, daß diese aus der WO 96/30003 bekannten Benzoessäurederivate nicht vollständig zufriedenstellend wirksam gegen Tumorgewebe sind. Überraschenderweise weisen aber einzelne Benzoessäurederivate im Gemisch miteinander eine sehr stark synergistische Wirkung für die Abtötung von Tumorgewebe auf und rufen in einem pH-Bereich von etwa 7,0 und darunter einen praktisch vollständigen Zelltod bei Tumorgewebe hervor.

Bei den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen handelt es sich um Gemische, die zumindest zwei der folgenden Benzoessäurederivate bzw. Zimtsäurederivate enthalten, die im Gemisch miteinander synergistisch wirken:

2-Acetoxybenzoessäure (Acetylsalicylsäure, Aspirin®)  
2-Hydroxybenzoessäure  
2-Methoxybenzoessäure  
2,4-Dihydroxybenzoessäure

2,4-Diacetoxybenzoesäure  
2-Hydroxy-4-aminobenzoesäure  
2,4-Dimethoxybenzoesäure  
2,6-Dihydroxybenzoesäure  
2,6-Dimethoxybenzoesäure  
2,3,4-Trimethoxybenzoesäure  
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoesäure  
5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure  
 $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure  
 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure  
 $\alpha$ -Fluorozimtsäure  
 $\alpha$ -Methylzimtsäure und  
 $\alpha$ -Acetamidozimtsäure.

Bevorzugt enthält das Gemisch mindestens zwei der folgenden Benzoesäurederivate, die im Gemisch miteinander synergistisch wirken:

2-Acetoxybenzoesäure (Acetylsalicylsäure, Aspirin®)  
2-Methoxybenzoesäure  
2,4-Diacetoxybenzoesäure  
2-Hydroxy-4-aminobenzoesäure  
2,4-Dimethoxybenzoesäure  
2,6-Dihydroxybenzoesäure  
2,6-Dimethoxybenzoesäure  
2,3,4-Trimethoxybenzoesäure  
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure und  
2,4,6-Trimethoxybenzoesäure.

Diese Verbindungen sind als solche bekannt, im Handel erhältlich und können von einem Fachmann ohne weiteres hergestellt werden. Ihren besonderen therapeutischen Nutzen zeigen sie jedoch erst in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen.

Eine synergistische Wirkung zeigt sich nicht bei allen Gemischen der vorstehend genannten Benzoessäurederivate. Ob bei einem Gemisch eine synergistische Wirkung vorliegt kann von einem Fachmann unter Berücksichtigung der nachstehenden Ausführungen leicht festgestellt werden.

Synergistisch wirkende Zusammensetzungen sind beispielsweise folgende Gemische:

2,6-Dihydroxybenzoessäure / 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure  
2,6-Dihydroxybenzoessäure / Acetylsalicylsäure  
2,6-Dihydroxybenzoessäure / 2,4-Diacetoxybenzoessäure  
2,6-Dihydroxybenzoessäure / 2,4-Dimethoxybenzoessäure  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / Acetylsalicylsäure  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / 2,4-Dimethoxybenzoessäure und  
2,4-Dimethoxybenzoessäure / 2-Acetoxybenzoessäure.

Weiterhin können auch folgende Gemische genannt werden:

2,4,6-Trihydroxybenzoessäure / 2,4-Dimethoxybenzoessäure  
2,4,6-Trihydroxybenzoessäure / 2,6-Dihydroxybenzoessäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoessäure / 2,6-Dihydroxybenzoessäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoessäure / 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoessäure / 2,4,6-Trihydroxybenzoessäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoessäure / 2,4-Dimethoxybenzoessäure.

Als weitere Gemische können genannt werden:

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure  
2-Acetoxybenzoessäure / 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure  
2-Acetoxybenzoessäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure  
5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure und  
2-Hydroxy-4-Aminobenzoessäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure.

Besonders bevorzugt werden die Gemische auch in Dreierkombinationen eingesetzt, wobei folgende Dreierkombinationen vorteilhafte synergistische Eigenschaften aufweisen:

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / 2-Acetoxybenzoessäure / 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / 2-Acetoxybenzoessäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure / 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure und

2-Acetoxybenzoessäure / 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure /  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure.

In den vorstehenden Gemischen kann anstelle der Acetylsalicylsäure auch die 2-Hydroxybenzoessäure (Salicylsäure) verwendet werden.

Als Beispiel für eine nicht-synergistische Zusammensetzung aus den vorstehenden Bestandteilen kann ein Gemisch aus 2,4-Diacetoxybenzoessäure und 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure genannt werden.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden aufgrund ihrer pH-Sensitivität nur in Krebstumoren und Metastasenbereichen aktiviert und stellen deshalb ein ideales Krebstherapeutikum dar. Auch ist besonders hervorzuheben, daß dieses neue Krebstherapeutikum unabhängig von der speziellen Krebsart generell auf alle Tumortypen wirkt.

Es wird angenommen, daß die erfindungsgemäßen Substanzgemische im protonierten Zustand toxische Eigenschaften aufweisen und auf die Tumoren als Zellgifte wirken.

Es ist bekannt, daß die pH-Werte im extrazellulären Tumorgewebe nochmals um ca. 0,5 pH-Einheiten abgesenkt werden können, indem man durch Glucoseverabreichung Acidosen



induziert. Eine solche Verabreichung von Glucose kann ebenfalls mit den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können die Wirkstoffe in beliebigen Anteilen aufweisen, sofern der synergistische Effekt noch auftritt. Wie die Wirksamkeit von Verbindungen und damit auch das Vorliegen eines synergistischen Effekts nachgewiesen werden kann, ist z.B. in der WO 96/30003 ausführlich beschrieben, und insoweit kann auf diese Druckschrift Bezug genommen werden. Ferner wird auf die folgenden Vergleichsbeispiele verwiesen.

Bevorzugt weisen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen die beiden Wirkstoffe im Verhältnis 1:9 bis 9:1, besonders bevorzugt im Verhältnis 2:1 bis 1:2 und insbesondere im Verhältnis von etwa 1:1 auf.

Die synergistische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen wurde durch in vitro Versuche eindeutig belegt. Im folgenden werden für folgende Substanzennamen folgende Kürzel verwendet:

Substanz 121 = Acetylsalicylsäure (2-Acetoxybenzoesäure)

Substanz 58a = 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure

Substanz 132 = 2,4-Diacetoxybenzoessäure

Substanz 136 = 2,6-Dihydroxybenzoessäure

Substanz 188 = 2,4-Dimethoxybenzoessäure.

Die erfindungsgemäßen Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Die Messungen wurden mit einem bei der Firma Boehringer (Mannheim) käuflichen "Cell-Death-Detection ELISA"-Kit, Kat.-Nr. 1774 425, durchgeführt. Die Verfahrensvorschrift wird von der Firma Boehringer mitgeliefert.

Die Ergebnisse können folgenden Tabellen 1 bis 3 entnommen werden. Der OD-Wert entspricht dem Zelltod.

Tabelle 1 (Photometrische Messung nach 35 Minuten)

Verbindung	initialer pH	OD (405-490 nm)
CAM (800 ng/ml)	pH 6,0	0,818
	pH 6,5	3,037
	pH 7,0	2,725
	pH 7,4	2,416
136 (5 mM)	pH 6,0	0,187
	pH 6,5	0,918
	pH 7,0	0,321
	pH 7,4	0,382
136 (7 mM)	pH 6,0	0,221
	pH 6,5	1,287
	pH 7,0	0,524
	pH 7,4	0,816
Negativkontrolle	pH 6,0	0,642
	pH 6,5	0,702
	pH 7,0	0,293
	pH 7,4	0,268
Positivkontrolle		3,145

Tabelle 2 (Photometrische Messung nach 35 Minuten)

Verbindung	initialer pH	OD (405-490 nm)
CAM (160 ng/ml)	pH 6,0	0,344
	pH 6,5	0,711
	pH 7,0	1,220
	pH 7,4	1,923
58a (15 mM)	pH 6,0	0,320
	pH 6,5	0,282
	pH 7,0	0,574
	pH 7,4	1,835
121 (10 mM)	pH 6,0	1,282
	pH 6,5	0,163
	pH 7,0	0,413
	pH 7,4	1,508
132 (10 mM)	pH 6,0	2,856
	pH 6,5	0,183
	pH 7,0	0,088
	pH 7,4	0,502
188 (15 mM)	pH 6,0	0,256
	pH 6,5	0,309
	pH 7,0	0,502
	pH 7,4	1,854
Negativkontrolle	pH 6,0	0,674
	pH 6,5	0,648
	pH 7,0	0,327
	pH 7,4	0,322
Positivkontrolle		1,940

Tabelle 3 (Photometrische Messung nach 20 Minuten)

Verbindung	initialer pH	OD (405-490 nm)
CAM (800 ng/ml)	pH 6,0	1,681
	pH 6,5	1,708
	pH 7,0	1,791
	pH 7,4	2,217
136 + 58a (5 mM/10 mM)	pH 6,0	0,206
	pH 6,5	0,745
	pH 7,0	2,036
	pH 7,4	0,793
136 + 121 (5 mM/5 mM)	pH 6,0	0,750
	pH 6,5	0,486
	pH 7,0	2,564
	pH 7,4	0,970
136 + 132 (5 mM/5 mM) 1. Versuch	pH 6,0	0,419
	pH 6,5	0,328
	pH 7,0	0,802
	pH 7,4	0,953
136 + 132 (5 mM/5 mM) 2. Versuch	pH 6,0	0,640
	pH 6,5	0,274
	pH 7,0	1,160
	pH 7,4	1,124
136 + 188 (5 mM/10 mM)	pH 6,0	0,211
	pH 6,5	1,728
	pH 7,0	1,426
	pH 7,4	0,804
58a + 121 (10 mM/5 mM)	pH 6,0	0,577
	pH 6,5	0,480
	pH 7,0	2,227
	pH 7,4	1,238
58a + 132 (10 mM/5 mM)	pH 6,0	0,152
	pH 6,5	0,241
	pH 7,0	0,417
	pH 7,4	1,082
58a + 188 (10 mM/5 mM)	pH 6,0	0,251
	pH 6,5	1,698
	pH 7,0	2,939
	pH 7,4	0,915
132 (5 mM)	pH 6,0	0,407
	pH 6,5	0,371
	pH 7,0	0,422
	pH 7,4	0,916
Negativkontrolle	pH 6,0	0,883
	pH 6,5	0,794
	pH 7,0	0,330
	pH 7,4	0,579
Positivkontrolle		1,219

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abbildungen 1 bis 3 zusammengefaßt, die den Tabellen 1 bis 3 entsprechen. In den Abbildungen wird in einem ELISA (Apoptose-KIT) mit RT112 in

Abhängigkeit vom pH-Wert der Zelltod aufgezeichnet. Das heißt, die Angabe auf der Y-Achse der Abbildungen ist ein Maß für den Zelltod, auf der X-Achse ist der pH-Wert der Zellen angegeben. Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Versuche, bei denen Einzelverbindungen eingesetzt wurden. Abbildung 3 zeigt die synergistische Wirkung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen gegenüber den Einzelverbindungen. Es fällt auf, daß bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,0 die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen einen Zelltod hervorrufen, der bevorzugt in der Nähe oder über dem CAM-Wert liegt, was praktisch einer vollständigen Zerstörung des Tumorgewebes entspricht.

Die in den Versuchen verwendete Apoptose auslösende Substanz CAM ist Camptothecin (CAM-Wert). In den Versuchen bedeutet Positivkontrolle, daß anstelle der durch die Substanzen induzierten apoptotischen Krebszellen ein Histon-DNA-Komplex mit bekannter Nachweisempfindlichkeit zur Detektion eingesetzt wird, das heißt ein künstliches Apoptose-Produkt wird vorgegeben. In den Versuchen bedeutet Negativkontrolle, daß die gleiche Nachweisprozedur durchgeführt wird, jedoch ohne Zugabe von Substanzen bzw. Substanzgemischen.

Aus den Vergleichsversuchen wird offensichtlich, daß bestimmte Gemische der vorstehend genannten Benzoessäurederivate eine synergistische Wirkung zeigen. Das Gemisch aus 2,4-Diacetoxybenzoessäure und 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure zeigt keine synergistische Wirkung, und die Fähigkeit des Gemischs, Tumorzellen abzutöten, ist nicht höher, als die von Einzelverbindungen, im Beispiel von 2,4-Diacetoxybenzoessäure.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können auf an sich bekannte Art und Weise zu Arzneimitteln für Säuger, bevorzugt Menschen, formuliert werden. In den Arzneimitteln liegen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen im Gemisch mit einem pharmazeutischen organischen oder anorganischen Träger, der für enterale oder parenterale Verabreichungen geeignet ist, vor. Die orale Verabreichung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen über Tabletten, Kapseln, Pulver oder in

flüssiger Form, wie als Suspensionen, in Lösung, als Emulsion oder als Sirup ist besonders bevorzugt.

Bei der Formulierung als Tabletten werden übliche Arzneimittelträger wie Natriumcitrat, Lactose, mikrokristalline Cellulose und Stärke, Schmiermittel wie wasserfreie Kieselsäure, hydriertes Castoröl, Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talk, sowie Bindemittel wie Stärkepaste, Glucose, Lactose, Gummi-Arabicum, Mannit, Magnesiumtrisilicat und Talk verwendet. Wenn die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen über Flüssigkeiten verabreicht werden sollen, können übliche flüssige Träger verwendet werden.

Bevorzugt ist ebenfalls eine Formulierung für Injektionen und Infusionen, wie es auf dem Fachgebiet bekannt und in einschlägigen Standardwerken beschrieben ist.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können ebenfalls als auf an sich bekannte Art und Weise als Depotformulierungen oder zu Arzneimitteln mit verzögerter oder hinhaltender Freisetzung formuliert werden.

Die Dosierungsform der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen hängt von der speziellen Zusammensetzung und weiteren Faktoren ab und kann von einem Fachmann aufgrund des Zustands des zu behandelnden Patienten, der Schwere und Art der zu behandelnden Krankheit, möglicher Nebenwirkungen der verabreichten Substanzgemische, usw., bestimmt werden.

Die Dosierung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann von einem Fachmann in Abhängigkeit der speziellen Erkrankung, dem Patienten und sonstigen Umständen bestimmt werden und beträgt z.B. 50 mg/kg Körpergewicht bis 300 mg/kg Körpergewicht, bevorzugt 100 mg/kg Körpergewicht bis 200 mg/kg Körpergewicht der erfindungsgemäßen Zusammensetzung pro Tag.

Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß die Verbindungen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zusammen verabreicht werden können oder nacheinander in derart kurzen Zeitabständen verabreicht werden können, daß sie ihre synergistische Wirkung noch aufweisen. Erfindungsgemäß ist sowohl die gleichzeitige Verabreichung eines geeignet formulierten Substanzgemischs umfaßt als auch das zeitversetzte oder gleichzeitige Verabreichen der geeignet formulierten einzelnen Bestandteile der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, sofern die Zeitabstände zwischen der Verabreichung der einzelnen Bestandteile nicht so groß sind, daß die synergistische Wirkung verlorenggeht.

Der zeitliche Abstand zwischen der Verabreichung der einzeln formulierten Bestandteile beträgt im allgemeinen nicht mehr als 24 Stunden, bevorzugt nicht mehr als eine Stunde. Besonders bevorzugt werden die jeweiligen Formulierungen gleichzeitig oder unmittelbar nacheinander verabreicht.

Die Erfindung betrifft damit auch ein Arzneimittelkit bestehend aus zwei Arzneimitteln jeweils enthaltend zumindest ein Benzoessäurederivat ausgewählt aus

2-Acetoxybenzoessäure (Acetylsalicylsäure, Aspirin®)

2-Hydroxybenzoessäure

2-Methoxybenzoessäure

2,4-Dihydroxybenzoessäure

2,4-Diacetoxybenzoessäure

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure

2,4-Dimethoxybenzoessäure

2,6-Dihydroxybenzoessäure

2,6-Dimethoxybenzoessäure

2,3,4-Trimethoxybenzoessäure

2,4,6-Trihydroxybenzoessäure

2,4,6-Trimethoxybenzoessäure

5-(2,4-Difluoro-phenyl)salicylsäure

$\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizmsäure

$\alpha$ -Fluoromizmsäure

$\alpha$ -Methylmizmsäure und

$\alpha$ -Acetamidomizmsäure.

und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel zur gleichzeitigen oder zeitlich versetzten Verabreichung, wobei das Arzneimittelkit zumindest zwei verschiedene Benzoesäurederivate enthält.

Die bevorzugten Wirkstoffkombinationen der Arzneimittelkits entsprechen den vorstehend ausgeführten bevorzugten Gemischen der Erfindung.

Unter einem Arzneimittelkit wird auch der Hinweis, beispielsweise auf dem Beipackzettel eines Benzoesäurehaltigen Präparates, verstanden, daß dieses Benzoesäurehaltige Präparat gleichzeitig oder zeitlich versetzt mit einem anderen Benzoesäurehaltigen Präparat verabreicht werden soll. Die Erfindung betrifft damit auch ein Arzneimittelkit wie vorstehend definiert, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die zwei Arzneimittel jeweils in einer separaten Packung vorliegen, wobei auf dem Beipackzettel zumindest einer der Packungen auf die gleichzeitige oder zeitlich versetzte Verabreichung mit dem anderen Arzneimittel hingewiesen wird.

Das folgende galenische Beispiel erläutert die Erfindung und ist nicht einschränkend.

#### Beispiel

Es wird eine Lösung aus 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure in destilliertem Wasser hergestellt, wobei die Konzentration der 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure so gewählt wird, daß die hergestellte Lösung isotonisch (34 mg/ml 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure) bis leicht hypertonisch (48 mg/ml 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure), steril und pyrogenfrei ist. Parallel dazu



wird eine Lösung aus 2-Acetoxybenzoesäure, die unter dem Handelsnamen Aspisol erhältlich ist, bereitgestellt. Beide Lösungen werden nacheinander an einen Patienten intravenös verabreicht, wobei die Verabreichung der 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure in einer Dosierung von 300 mg/kg Körpergewicht und die Verabreichung der 2-Acetoxybenzoesäure in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht erfolgt.

Patentansprüche

1. Synergistisch wirkende Zusammensetzung enthaltend ein Gemisch aus zumindest zwei Benzoessäurederivaten ausgewählt aus

2-Acetoxybenzoessäure (Acetylsalicylsäure)

2-Hydroxybenzoessäure

2-Methoxybenzoessäure

2,4-Dihydroxybenzoessäure

2,4-Diacetoxybenzoessäure

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure

2,4-Dimethoxybenzoessäure

2,6-Dihydroxybenzoessäure

2,6-Dimethoxybenzoessäure

2,3,4-Trimethoxybenzoessäure

2,4,6-Trihydroxybenzoessäure

2,4,6-Trimethoxybenzoessäure

5-(2,4-Difluoro-phenyl)salicylsäure

$\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure

$\alpha$ -Fluorozimtsäure

$\alpha$ -Methylzimtsäure und

$\alpha$ -Acetamidozimtsäure.

2. Synergistisch wirkende Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein synergistisches Gemisch aus jeweils

2,6-Dihydroxy- und 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure,

2,6-Dihydroxy- und 2-Acetoxybenzoessäure (Acetylsalicylsäure),

2,6-Dihydroxy- und 2,4-Diacetoxybenzoessäure,

2,6-Dihydroxy- und 2,4-Dimethoxybenzoessäure,

2-Hydroxy-4-amino- und 2-Acetoxybenzoessäure  
(Acetylsalicylsäure),

2-Hydroxy-4-amino- und 2,4-Dimethoxybenzoessäure,

2,4-Dimethoxy- und 2-Acetoxybenzoessäure,

2,4,6-Trihydroxy- und 2,4-Dimethoxybenzoesäure,  
2,4,6-Trihydroxy- und 2,6-Dihydroxybenzoesäure,  
2,4,6-Trimethoxy- und 2,6-Dihydroxybenzoesäure,  
2,4,6-Trimethoxy- und 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure,  
2,4,6-Trimethoxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure oder von  
2,4,6-Trimethoxy- und 2,4-Dimethoxybenzoesäure,

enthält.

3. Synergistisch wirkende Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein synergistisches Gemisch aus jeweils

2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure und 5-(2,4-Difluorophenyl)-salicylsäure,  
2-Acetoxybenzoessäure und 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure,  
2-Acetoxybenzoessäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure,  
5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure,  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure,  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure und 2-Acetoxybenzoessäure und 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure,  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure und 2-Acetoxybenzoessäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure,  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure und 5-(2,4-Difluorophenyl)-salicylsäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure oder von  
2-Acetoxybenzoessäure und 5-(2,4-Difluorophenyl)salicylsäure und  $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure

enthält.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthaltend 2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure im Gemisch mit 2,4-Dimethoxybenzoessäure.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthaltend 2,6-Dihydroxybenzoessäure im Gemisch mit Acetylsalicylsäure.

6. Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthaltend 2-Hydroxy-4-aminobenzoesäure im Gemisch mit Acetylsalicylsäure.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthaltend 2-Hydroxy-4-aminobenzoesäure im Gemisch mit 2,6-Dihydroxybenzoesäure.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthaltend 2,6-Dihydroxybenzoesäure im Gemisch mit 2,4-Dimethoxybenzoesäure.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Verwendung als Arzneimittel.
10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Verwendung als Anti-Tumormittel.
11. Arzneimittel enthaltend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und einen pharmazeutisch verträglichen inerten Arzneimittelträger.
12. Arzneimittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es die jeweiligen Wirkstoffe im Verhältnis 1:9 bis 9:1, vorzugsweise im Verhältnis 2:1 bis 1:2, und besonders bevorzugt im Verhältnis 1:1 aufweist.
13. Arzneimittel nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich Glucose enthält.
14. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen.
15. Arzneimittelkit bestehend aus zwei Arzneimitteln jeweils enthaltend zumindest ein Benzoesäurederivat, ausgewählt aus

2-Acetoxybenzoesäure (Acetylsalicylsäure)

2-Hydroxybenzoesäure

2-Methoxybenzoesäure

2,4-Dihydroxybenzoesäure

2,4-Diacetoxybenzoesäure  
2-Hydroxy-4-aminobenzoessäure  
2,4-Dimethoxybenzoesäure  
2,6-Dihydroxybenzoesäure  
2,6-Dimethoxybenzoesäure  
2,3,4-Trimethoxybenzoesäure  
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure  
2,4,6-Trimethoxybenzoesäure  
5-(2,4-Difluoro-phenyl)salicylsäure  
 $\alpha$ -Cyano-3-hydroxyzimtsäure  
 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure  
 $\alpha$ -Fluorozimtsäure  
 $\alpha$ -Methylzimtsäure und  
 $\alpha$ -Acetamidozimtsäure.

zur gleichzeitigen oder zeitlich versetzten Verabreichung,  
wobei das Arzneimittelkit zumindest zwei verschiedene  
Benzoesäurederivate umfaßt.

16. Arzneimittelkit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,  
daß die zwei Arzneimittel in verschiedenen Verpackungen  
vorliegen, wobei auf dem Beipackzettel des einen Arzneimittels  
und/oder auf dem Beipackzettel des anderen Arzneimittels auf  
die gleichzeitige oder zeitlich versetzte Verabreichung der  
Arzneimittel hingewiesen wird.

FIG. 1

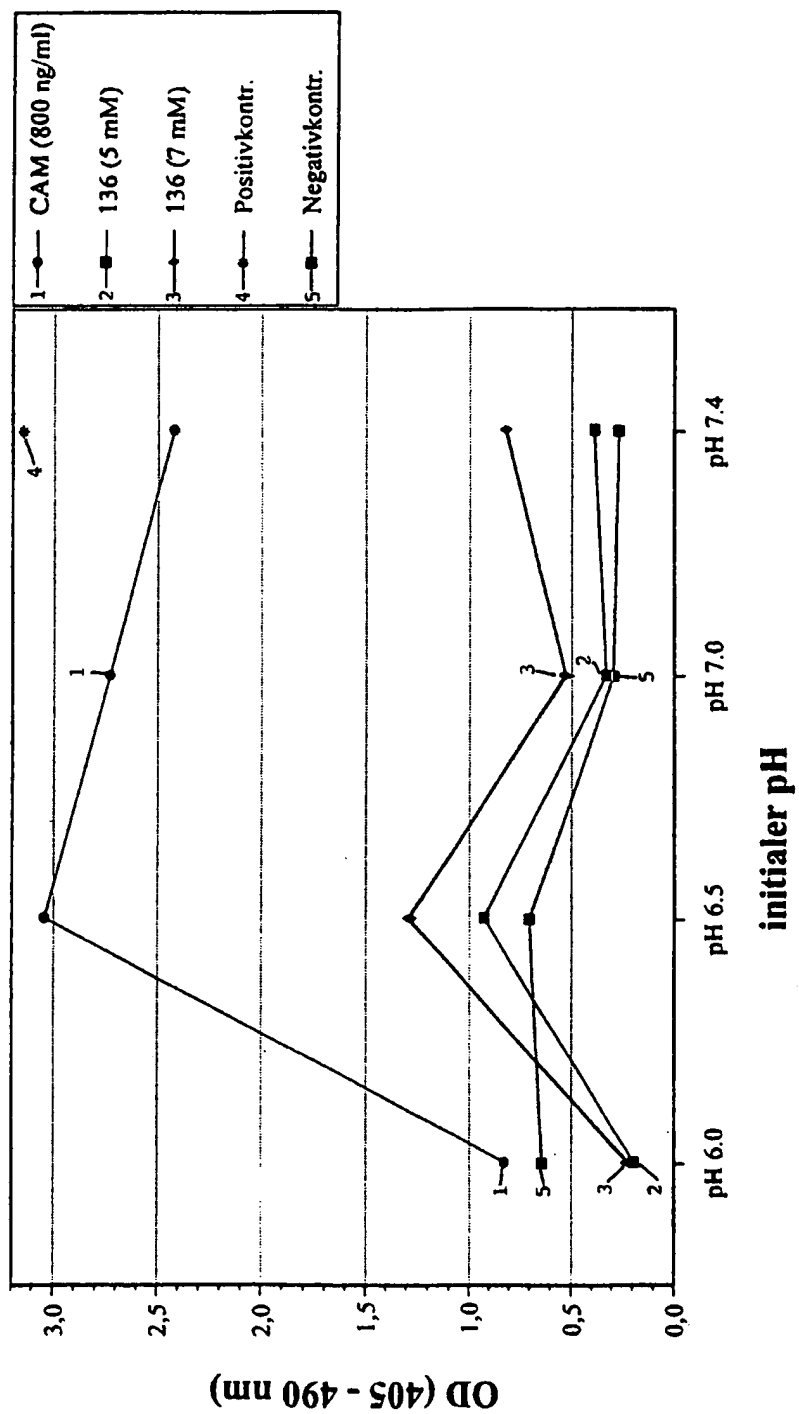
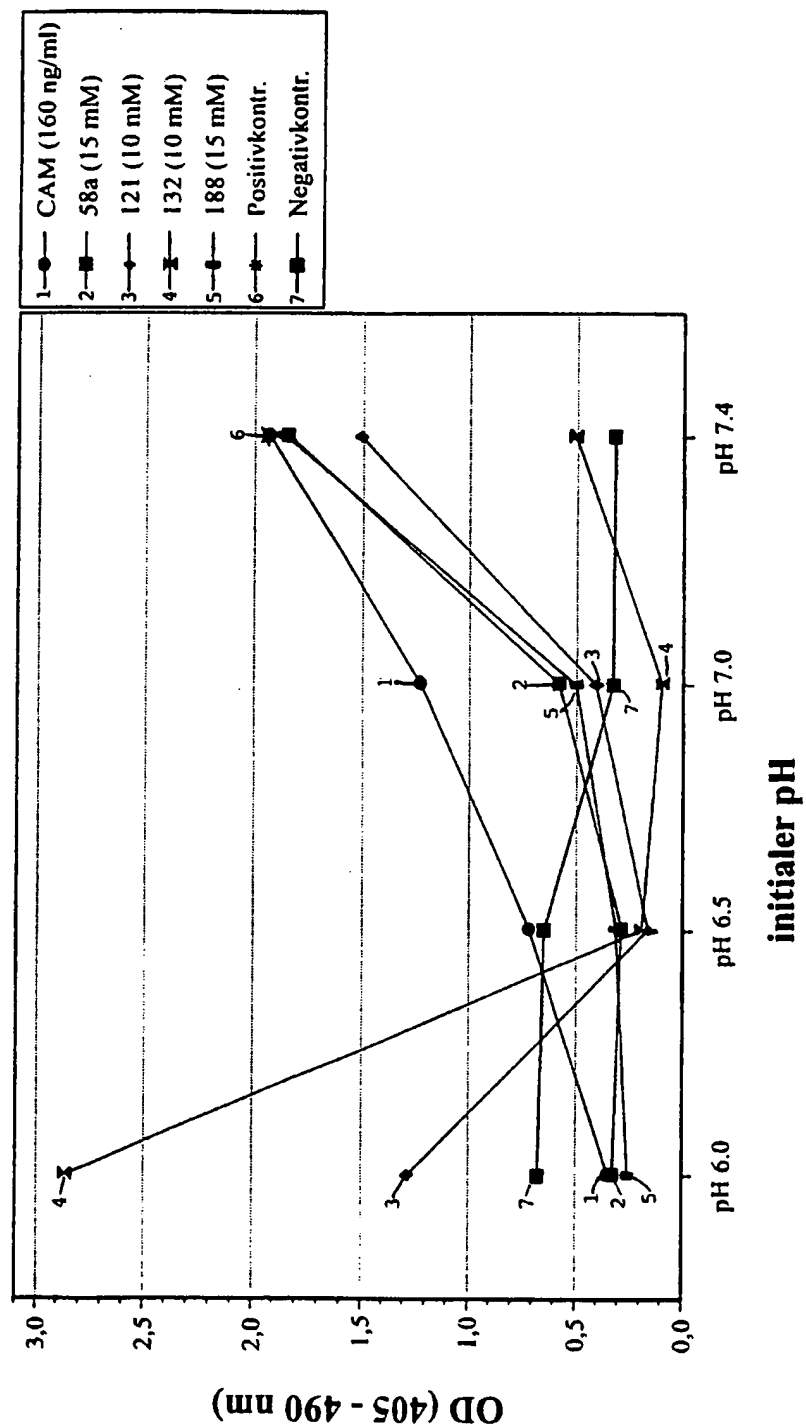
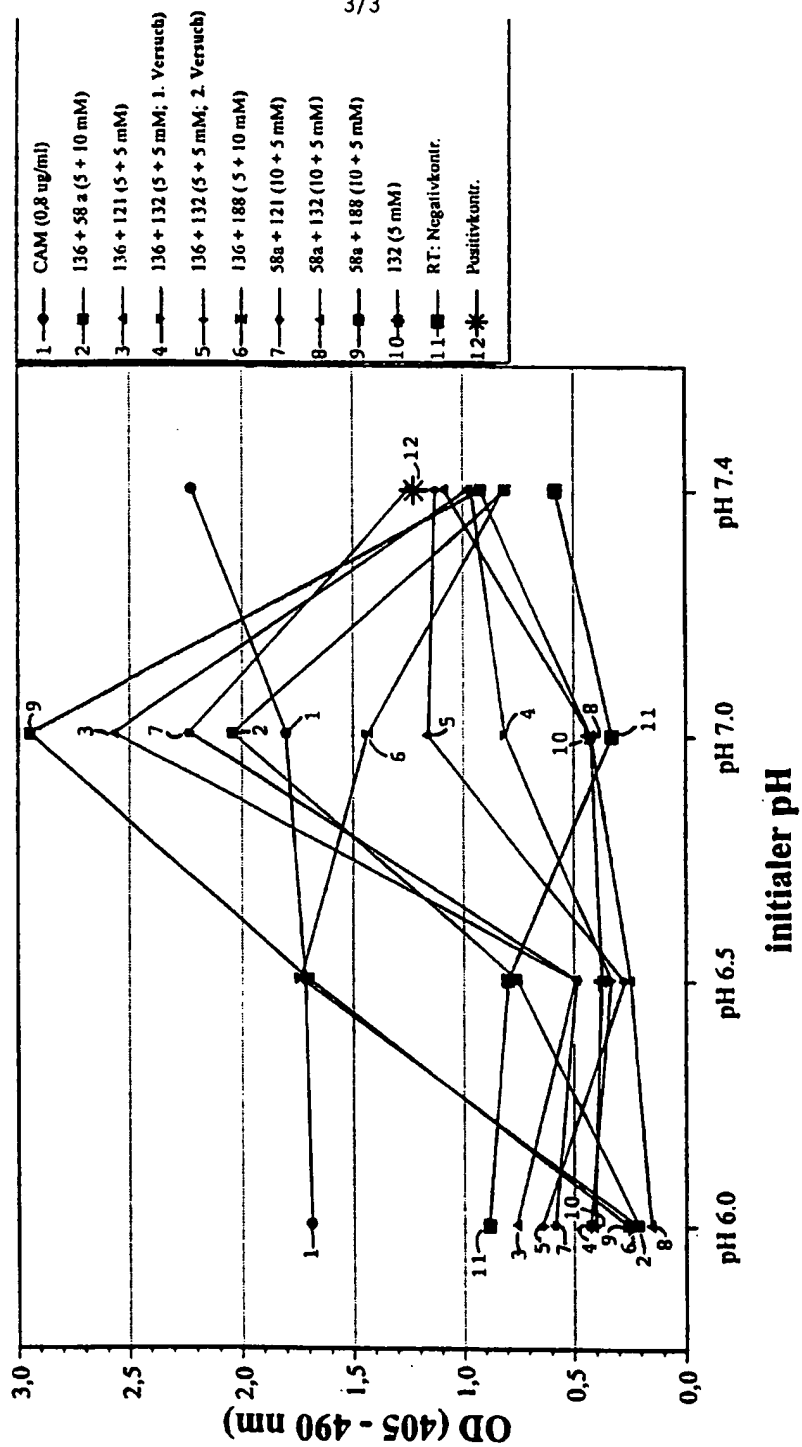


FIG. 2



**FIG. 3**





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/19 A61K31/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 30003 A (KREUTZ WERNER) 3 October 1996 cited in the application see the whole document ---	1-16
X	DE 44 07 484 A (KREUTZ WERNER PROF DR) 8 June 1995 cited in the application see column 3, line 22 see column 4, line 23-33 ---	1,3
X	US 4 871 570 A (BARNETT RONALD E ET AL) 3 October 1989 see examples 1,2 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 1998

Date of mailing of the international search report

21/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Engl, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/02939

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 8801  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class B05, AN 88-003456  XP002076797  &amp; JP 62 267 232 A (ARAI S)  see abstract</p> <p>-----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 98/02939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9630003 A	03-10-1996	AU 5099696 A DE 19680202 D EP 0817623 A	16-10-1996 21-08-1997 14-01-1998
DE 4407484 A	08-06-1995	NONE	
US 4871570 A	03-10-1989	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02939

<b>A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 A61K31/19 A61K31/60		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 30003 A (KREUTZ WERNER) 3. Oktober 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-16
X	DE 44 07 484 A (KREUTZ WERNER PROF DR) 8. Juni 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 3, Zeile 22 siehe Spalte 4, Zeile 23-33 ---	1,3
X	US 4 871 570 A (BARNETT RONALD E ET AL) 3. Oktober 1989 siehe Beispiele 1,2 ---	1
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  8. September 1998		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  21/09/1998
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Engl, B

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Unionales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/02939

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 8801  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class 805, AN 88-003456  XP002076797  &amp; JP 62 267 232 A (ARAI S)  siehe Zusammenfassung  -----</p>	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02939

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9630003 A	03-10-1996	AU 5099696 A DE 19680202 D EP 0817623 A	16-10-1996 21-08-1997 14-01-1998
DE 4407484 A	08-06-1995	KEINE	
US 4871570 A	03-10-1989	KEINE	